



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 39/295 // C12N 15/38, 15/44, 15/31</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/03198</b> (43) Date de publication internationale: <b>29 janvier 1998 (29.01.98)</b>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR97/01314</b></p> <p>(22) Date de dépôt international: <b>15 juillet 1997 (15.07.97)</b></p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/09400 19 juillet 1996 (19.07.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): <b>MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).</b></p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): <b>AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR]; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR).</b></p> <p>(74) Mandataire: <b>COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</b></p>		<p>(81) Etats désignés: <b>AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b></p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i></p>	
<p>(54) Title: <b>POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA FOR TREATING HORSE DISEASES</b></p> <p>(54) Titre: <b>FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES DU CHEVAL</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>A vaccine formula for treating equine and particularly horse diseases, including at least three polynucleotide vaccine valencies that each include a plasmid containing an equine pathogen valency gene capable of being expressed <i>in vivo</i> in host cells. Said valencies are selected from the group which consists of equine rhinopneumonitis virus EHV, equine influenza virus EIV and tetanus antitoxin. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of gB and gD for equine rhinopneumonitis virus, HA, NP and N for equine influenza virus, and a gene coding for all or part of subunit C of <i>Cl. tetani</i>.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La formule de vaccin contre des pathologies des équidés et notamment des chevaux, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer <i>in vivo</i> dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène équin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la rhinopneumonie équine EHV, virus de la grippe équine EIV et anatoxine de la toxine tétanique, ces plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la rhinopneumonie équine, HA, NP, N pour le virus de la grippe équine et un gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de <i>Cl. tetani</i>.</p>			

## FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES DU CHEVAL

5 La présente invention est relative à une formule de vaccin permettant la vaccination des équidés, notamment des chevaux. Elle est également relative à une méthode de vaccination correspondante.

10 La pathologie des chevaux présente une assez grande diversité. Outre les pathologies respiratoires bien connues, telles que la rhinopneumonie et la grippe, les chevaux sont sensibles, notamment sur le continent américain, aux diverses encéphalites. Enfin, les chevaux présentent diverses autres pathologies parmi lesquelles on peut citer, notamment, le tétanos, la maladie de Lyme, l'artérite équine, sans oublier 15 les risques d'exposition au virus de la rage.

20 Les conditions d'exposition des chevaux aux divers microorganismes pathogènes ont été multipliées par les déplacements de nombreux chevaux sur les distances importantes par voie de terre ou par voie aérienne, de sorte que le risque infectieux a tendance à augmenter.

25 Or, compte-tenu du coût élevé de ces animaux, notamment dans le cas des reproducteurs, des chevaux de selle et des chevaux de course, il est économiquement important de contrôler le plus possible les risques infectieux se traduisant par de longues indisponibilités de l'animal, voir sa perte. Il existe déjà un certain nombre de vaccins pour chevaux, dont l'efficacité est variable.

30 Ainsi, ont été développés, pour la rhinopneumonie équine, provoquée par les différentes souches d'herpès virus équin (EHV), des vaccins inactivés ou de sous-unités, qui présentent cependant tous un certain nombre de limites se traduisant par des protections incomplètes et de courte durée et éventuellement des problèmes d'innocuité liés aux adjuvants utilisés.

35 La grippe équine constitue également une pathologie importante, que l'on cherche, également à prévenir par la vaccination. Les vaccins utilisés sont des vaccins inactivés ou de sous-unités, qui présentent une certaine efficacité mais qui

(intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique, mucosale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., *Nature* 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant d'assurer la transfection à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux, et les tissus mammaires (Furth et al., *Analytical Biochemistry*, 205, 365-368, 1992).

10 Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés, par exemple au sein des liposomes ou de lipides cationiques.

15 Des vecteurs polynucléotidiques, intégrant les gènes HA ou NP, ont été essayés pour le virus de la grippe (influenza virus) chez la souris, le furet et le poulet. Aucune donnée n'est disponible chez le cheval.

20 Concernant le tétanos, il a été rapporté, récemment, que l'immunisation de souris par un plasmide exprimant, avec le fragment C, la région C-terminale non toxique de la toxine tétanique, induisait l'apparition d'anticorps séro-protecteurs chez la souris.

25 Il n'est cependant pas possible de transposer directement les enseignements des résultats obtenus chez ces animaux de faibles longévités à celui d'autres mammifères, et notamment les mammifères de grandes tailles.

La protection des équidés et notamment des chevaux contre la pathologie infectieuse demande donc toujours à être améliorée.

30 L'invention se propose de fournir une formule de vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination des équidés, et notamment des chevaux, contre un certain nombre d'agents pathogènes.

35 Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences

modifiées pour faciliter l'expression *in vivo* par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

5 Ainsi, de manière particulièrement préférée, le vaccin selon l'invention comprend dans la valence rhinopneumonie équine, au moins un antigène de la souche EHV-1 et au moins un antigène de la souche EHV-4, et de préférence le même type d'antigène.

10 Les quantités thérapeutiquement efficaces des valences polynucléotidiques sont contenues ou destinées à être contenues, dans un véhicule convenable pour une administration à l'animal, et de préférence pour une administration intramusculaire. De préférence, ce véhicule est un véhicule aqueux dépourvu de constituants huileux.

15 En ce qui concerne la valence rhinopneumonie équine, on préférera associer les gènes gB et gD, de préférence des souches EHV, notamment souches 1 et 4.

20 En ce qui concerne la valence grippe équine, on préfère utiliser le gène codant pour l'hémagglutinine HA ou l'association des gènes codant pour HA et NP. De préférence, on associera dans le même vaccin, les séquences HA de virus influenza, en particulier des différentes souches rencontrées sur le terrain. En revanche, NP assure une protection croisée et l'on pourra donc se contenter de la séquence d'une seule souche du virus.

25 Pour la valence téтанos, on préférera la sous-unité C éventuellement modifiée par mutation ou délétion.

30 L'association de gènes codant pour plusieurs antigènes d'une même valence, ou d'une même souche dans une valence, peut être réalisée par le mélange de plasmide exprimant un seul antigène, ou au contraire en insérant plusieurs gènes dans un même plasmide.

35 La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant un ou des antigènes de chaque valence, mais on peut également prévoir de faire exprimer plusieurs antigènes de plusieurs valences par un même vecteur de type plasmidique.

Dans une forme perfectionnée de l'invention, la

provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

5 Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine (Polmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et Zhenlin et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

10 Lorsque plusieurs gènes sont présent dans un même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

15 10 L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des agents pathogènes précités, et notamment de la rhinopneumonie ou de la maladie de Lyme, de l'artérite équine, de l'encéphalite de l'Est, de l'encéphalite de l'Ouest et de l'encéphalite vénézuélienne, les gènes étant 15 ceux décrits plus haut. Ces formules peuvent comprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes d'un même pathogène et leur combinaison, la composition des plasmides, les volumes de doses, les dosages, 20 etc.

25 La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des équidés et notamment des chevaux contre des maladies infectieuses, comprenant l'administration d'une dose efficace d'une formule de vaccin, multivalente ou monovalente, telle que décrite plus haut.

Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de la formule de vaccin.

30 30 Les formules de vaccin selon l'invention pourront être administrées par les différents voies d'administration proposées dans le cadre général de la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues. On préférera cependant nettement la voie intramusculaire.

35 On peut aussi vacciner par voie intradermique à l'aide d'un injecteur par jet liquide, de préférence par jets multiples, et en particulier un injecteur utilisant une tête d'injection munie de plusieurs trous ou buses, notamment comprenant de 5 à 6 trous ou buses, tel que l'appareil Pigjet

l'administration du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

5 L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant une formule de vaccin selon l'invention et un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

10 L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin, à savoir la préparation des valences et leurs mélanges, telle qu'elle ressort de cette description.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins.

15

20

25

30

35

SEQ ID N° 8 : Oligonucléotide AB076  
SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide AB015  
SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide AB016  
SEQ ID N° 11 : Oligonucléotide AB077  
5 SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide AB078  
SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide AB186  
SEQ ID N° 14 : Oligonucléotide AB187  
SEQ ID N° 15 : Séquence du gène HA Grippe équine (souche Fontainebleau)  
SEQ ID N° 16 : Oligonucléotide AB156  
10 SEQ ID N° 17 : Oligonucléotide AB159  
SEQ ID N° 18 : Oligonucléotide AB157  
SEQ ID N° 19 : Oligonucléotide AB128  
SEQ ID N° 20 : Oligonucléotide AB129  
SEQ ID N° 21 : Oligonucléotide AB038  
15 SEQ ID N° 22 : Oligonucléotide AB039  
SEQ ID N° 23 : Oligonucléotide AB176  
SEQ ID N° 24 : Oligonucléotide AB177  
SEQ ID N° 25 : Oligonucléotide AB174  
SEQ ID N° 26 : Oligonucléotide AB175  
20 SEQ ID N° 27 : Oligonucléotide AB180  
SEQ ID N° 28 : Oligonucléotide AB181  
SEQ ID N° 29 : Oligonucléotide AB178  
SEQ ID N° 30 : Oligonucléotide AB179  
SEQ ID N° 31 : Oligonucléotide AB184  
25 SEQ ID N° 32 : Oligonucléotide AB185  
SEQ ID N° 33 : Oligonucléotide AB182  
SEQ ID N° 34 : Oligonucléotide AB183  
SEQ ID N° 35 : Oligonucléotide AB011  
SEQ ID N° 36 : Oligonucléotide AB012

ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 5 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

10

#### **Exemple 4 : Isolement des ARNs génomiques viraux**

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987. 15 162. 156-159).

#### **Exemple 5 : Techniques de biologie moléculaire**

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les 20 techniques standards de biologie moléculaire décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "Geneclean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

25

#### **Exemple 6 : Technique de RT-PCR**

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes 30 devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (Sambrook J..*et al.* 1989). Chaque

5'CTAGTCTAGATTAAACCATTTTCGCTTCATGG 3'

pour amplifier un fragment de 2949 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du EHV-4 sous la forme d'un fragment *PstI-XbaI*. Après purification, le produit de PCR a été digéré par *PstI* et *XbaI* pour donner un 5 fragment *PstI-XbaI* de 2931 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *XbaI*, pour donner le plasmide pAB031 (7806 pb) (Figure N° 3).

10 **Exemple 10 : Construction du plasmide pAB013 (gène EHV-1 gD)**

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 1 (EHV-1) (Souche Kentucky D) (J.C. Audonnet *et al.* J. Gen. Virol. 1990. 71. 2969-2978) et avec les oligonucléotides suivants:

AB030 (32 mer) (SEQ ID N° 5)

15 5'AAAAGTGCAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATG 3'

AB031 (37 mer) (SEQ ID N° 6)

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGGGTATTTAACATCC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gD (EHV-1 gD) sous la forme d'un fragment *PstI-BamHI*. Après purification, le produit de PCR de 1228 pb a

20 été digéré par *PstI* et *BamHI* pour isoler un fragment *PstI-BamHI* de 1211 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB013 (6070 pb) (Figure N° 4).

25 **Exemple 11 : Construction du plasmide pAB032 (gène EHV-4 gD)**

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 4 (EHV-4) (A. Cullinane *et al.* J. Gen. Virol. 1993. 74. 1959-1964) et avec les oligonucléotides suivants:

AB075 (33 mer) (SEQ ID N° 7)

30 5'AAAAGTGCAGATATGTCTACCTTCAAGCCTATG 3'

AB076 (33 mer) (SEQ ID N° 8)

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGAGTATTTGAC 3'

5'ACCGCGTCGACGCATGAAGACAAACCATTATTTG 3'

AB078 (34 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CGCGGATCCTCAAATGCAAATGTTGCATCTGATG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du virus de la grippe équine

5 sous la forme d'un fragment *Sall*-*BamHI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 1729 pb a été digéré par *Sall* et *BamHI* pour isoler un fragment *Sall*-*BamHI* de 1717 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB033 (6584 pb) (Figure N° 7).

10

**Exemple 14 : Construction du plasmide pAB099 (gène Grippe équine HA souche Fontainebleau)**

Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche Fontainebleau), préparé selon

15 l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB186 (32 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTTGC GGCCGATGAAGACAAACCATTATTTG 3'

AB187 (35 mer) (SEQ ID N° 14)

5'TTTGC GGCCGCTTACTCAAATGCAAATGTTGCATC 3'

20 pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du virus de la grippe équine (souche Fontainebleau) (Figure N° 8 et SEQ ID N° 15) sous la forme d'un

fragment *NotI*-*NotI*. Après purification le produit de RT-PCR de 1724 pb a été digéré par *NotI* pour isoler un fragment *NotI*-*NotI* de 1710 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec

25 *NotI*, pour donner le plasmide pAB099 (6625 pb) qui contient le gène HA (grippe équine souche Fontainebleau) dans la bonne orientation par rapport au promoteur (Figure N° 9).

**Exemple 15 : Construction du plasmide pAB085 (gène Grippe équine NP souche 30 Prague)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche H7N7 Prague) (O.

**Exemple 17 : Construction du plasmide pAB070 (gène sous-unité C toxine tétanique)**

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de *Clostridium tetani* (Souche CN3911) (N. Fairweather *et al.* J. Bact. 1986. 165. 21-27), préparé 5 selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB128 (34 mer) (SEQ ID N° 19)  
 5'AAACTGCAGATGAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG 3'  
 AB129 (30 mer) (SEQ ID N° 20)  
 5'TTTGGATCCTTAATCATTGTCCATCCTTC 3'  
 10 pour isoler la séquence codant pour la sous-unité C de la toxine de *Clostridium tetani* sous la forme d'un fragment *PstI*-*BamHI*. Après purification, le produit de PCR de 1377 pb a été digéré par *PstI* et *BamHI* pour isoler un fragment *PstI*-*BamHI* de 1361 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 . (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide 15 pAB070 (6219 pb) (Figure N° 12).

**Exemple 18 : Construction du plasmide pAB017 (gène ospA de *Borrelia burgdorferi*)**

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de *Borrelia burgdorferi* (Souche B31) (S. Bergstrom *et al.* Mol. Microbiol. 1989. 3. 479- 20 486), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB038 (37 mer) (SEQ ID N° 21)  
 5'ACCGCGTCGACTATGAAAAAAATTTATTGGGAATAGG 3'  
 25 AB039 (34 mer) (SEQ ID N° 22)  
 5'CGCGGATCCCTTATTTAAAGCGTTTTAATTTC 3'  
 pour isoler le gène codant pour la protéine de membrane OspA sous la forme d'un fragment *Sall*-*BamHI*. Après purification, le produit de PCR de 842 pb a été digéré par *Sall* et *BamHI* pour isoler un fragment *Sall*-*BamHI* de 829 pb. Ce 30 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB017 (5698 pb) (Figure N° 13).

15).

**Exemple 21 : Construction du plasmide pAB096 (gène E2 du virus de l'encéphalite de l'Ouest)**

5 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Ouest (WEV) (Souche BSF1703) (C. Hahn *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. 85. 5997-6001), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB180 (35 mer) (SEQ ID N° 27)

10 5'ACGCGTCGACATGAGCATTACCGATGACTTCACAC 3'

AB181 (44 mer) (SEQ ID N° 28)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCAAGCGTTGGTTGGCCGAATACAG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine E2 du WEV sous la forme d'un fragment SalI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1304 pb a été 15 digéré par *SalI* et *BamHI* pour isoler un fragment SalI-BamHI de 1291 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *SalI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB096 (6159 pb) (Figure N° 16).

20 **Exemple 22 : Construction du plasmide pAB095 (gène C du virus de l'encéphalite de l'Ouest)**

Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Ouest (WEV) (Souche BSF1703) (C. Hahn *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. 85. 5997-6001), préparé selon l'exemple 4, et 25 avec les oligonucléotides suivants:

AB178 (34 mer) (SEQ ID N° 29)

5'ACGCGTCGACATGTTCCATACCCTCAGCTGAAC 3'

AB179 (44 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCACCAACGGTCAGAACCTTCGGGG 3'

30 pour isoler le gène codant pour la protéine de capsidé C du virus WEV sous la forme d'un fragment SalI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 809 pb a été digéré par *SalI* et *BamHI* pour isoler un fragment SalI-BamHI de

forme d'un fragment *PstI*-*BamHI*. Après purification, le produit de RT-PCR de 856 pb a été digéré par *PstI* et *BamHI* pour isoler un fragment *PstI*-*BamHI* de 839 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB097 5 (5698 pb) (Figure N° 19).

**Exemple 25 : Construction du plasmide pAB041 (gène G du virus de la rage)**  
Une réaction RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la rage (Souche ERA) (A. Anilionis *et al.* *Nature*. 1981. 294. 275-278), 10 préparé selon l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:  
AB011 (33 mer) (SEQ ID N° 35)  
5'AAA~~ACTGCAGAGATGGT~~CCTCAGGCTCTCCTG 3'  
AB012 (34 mer) (SEQ ID N° 36)  
5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'  
15 pour amplifier un fragment de 1589 pb contenant le gène codant pour la protéine G du virus de la rage. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par *PstI* et *BamHI* pour donner un fragment *PstI*-*BamHI* de 1578 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB041 (6437 pb) (Figure 20 N° 20).

#### **Exemple 26 : Préparation et purification des plasmides**

Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides 25 purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold 30 Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO 96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des

## REVENDICATIONS

1. Formule de vaccin contre des pathologies des équidés et notamment des chevaux, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer *in vivo* dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène équin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la rhinopneumonie équine EHV, virus de la grippe équine EIV et le téтанос, ces plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la rhinopneumonie équine, HA, NP, N pour le virus de la grippe équine et un gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de la toxine tétanique.
2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce que le vaccin comprend dans la valence rhinopneumonie équine, au moins un antigène de la souche EHV-1 et au moins un antigène de la souche EHV-4, de préférence le même type d'antigène.
3. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend les gènes gB et gD du virus de la rhinopneumonie équine.
4. Formule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène codant pour l'hémagglutinine HA ou l'association des gènes codant pour HA et NP du virus de la grippe équine.
5. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte une ou plusieurs autres valences d'autres pathogènes des équins, choisis parmi le groupe consistant en virus de l'encéphalite de l'Est EEV, de l'encéphalite de l'Ouest WEV et de l'encéphalite vénézuélienne VEV, de préférence les trois simultanément, valence de la maladie de Lyme, virus de l'artérite équine et virus de la rage, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi les gènes des antigènes C et E2 des encéphalites, OspA, OspB et p100 de la maladie de Lyme, E, M et N de l'artérite équine et le gène G pour la rage.

1/21

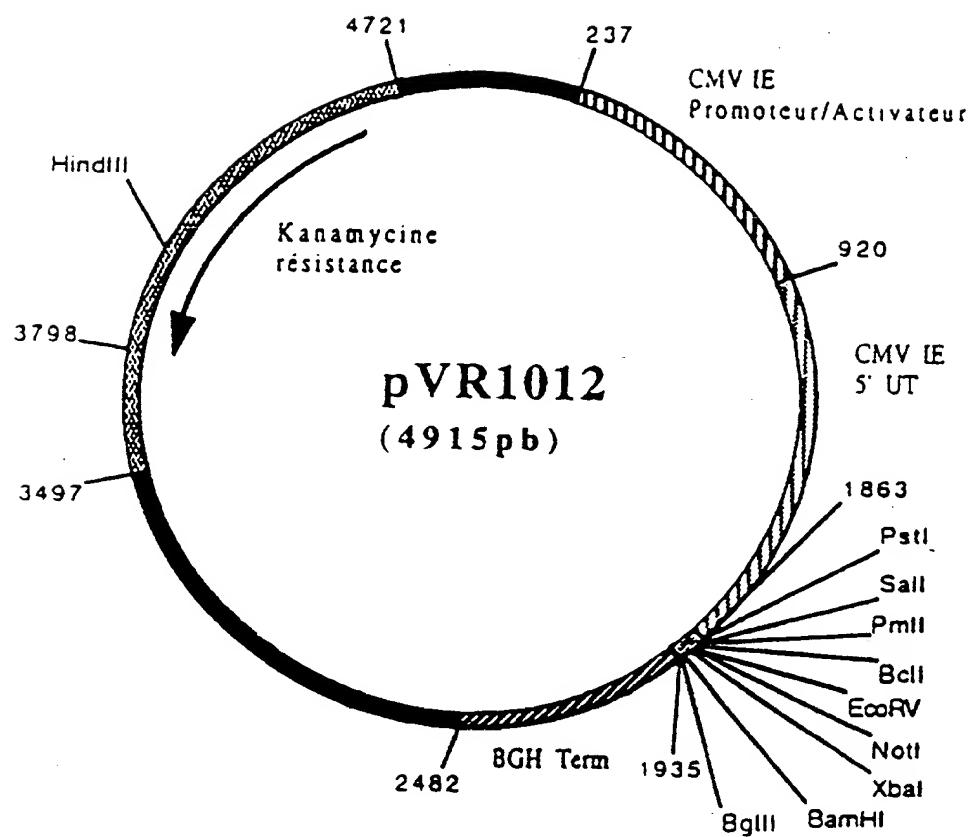


Figure N° 1

3 / 21

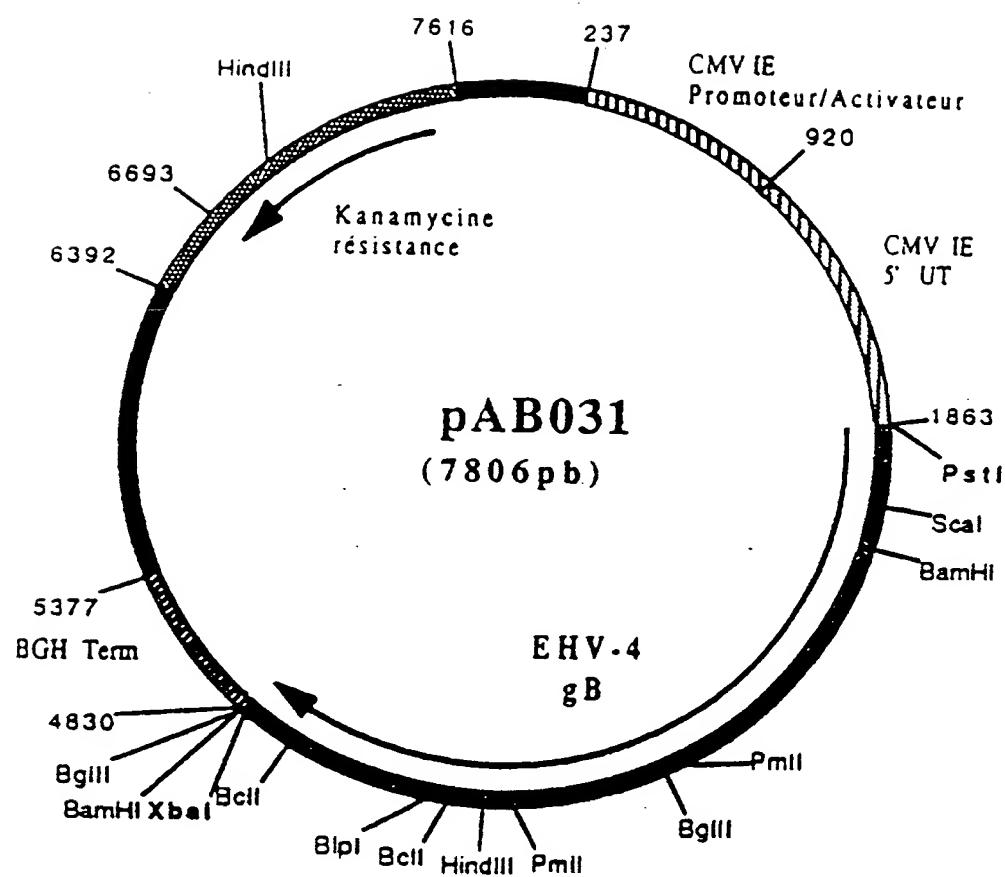


Figure N° 3

5 / 21

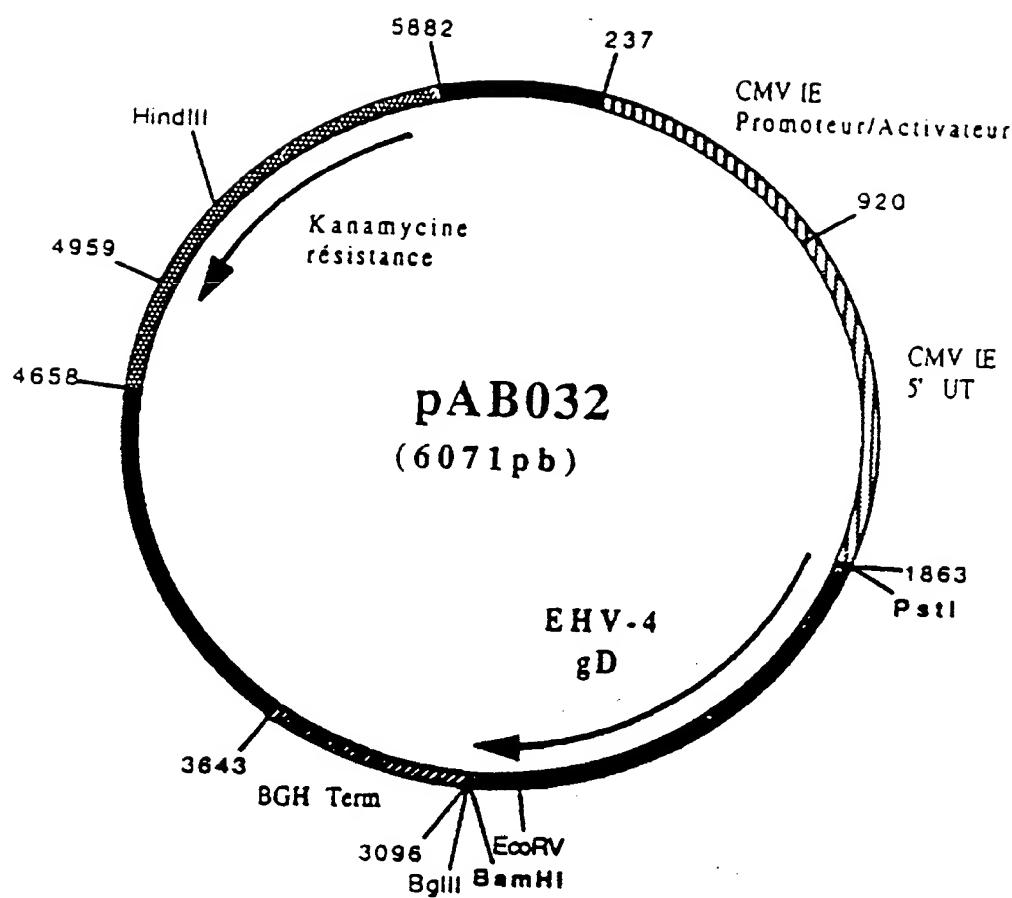


Figure N° 5

7/21

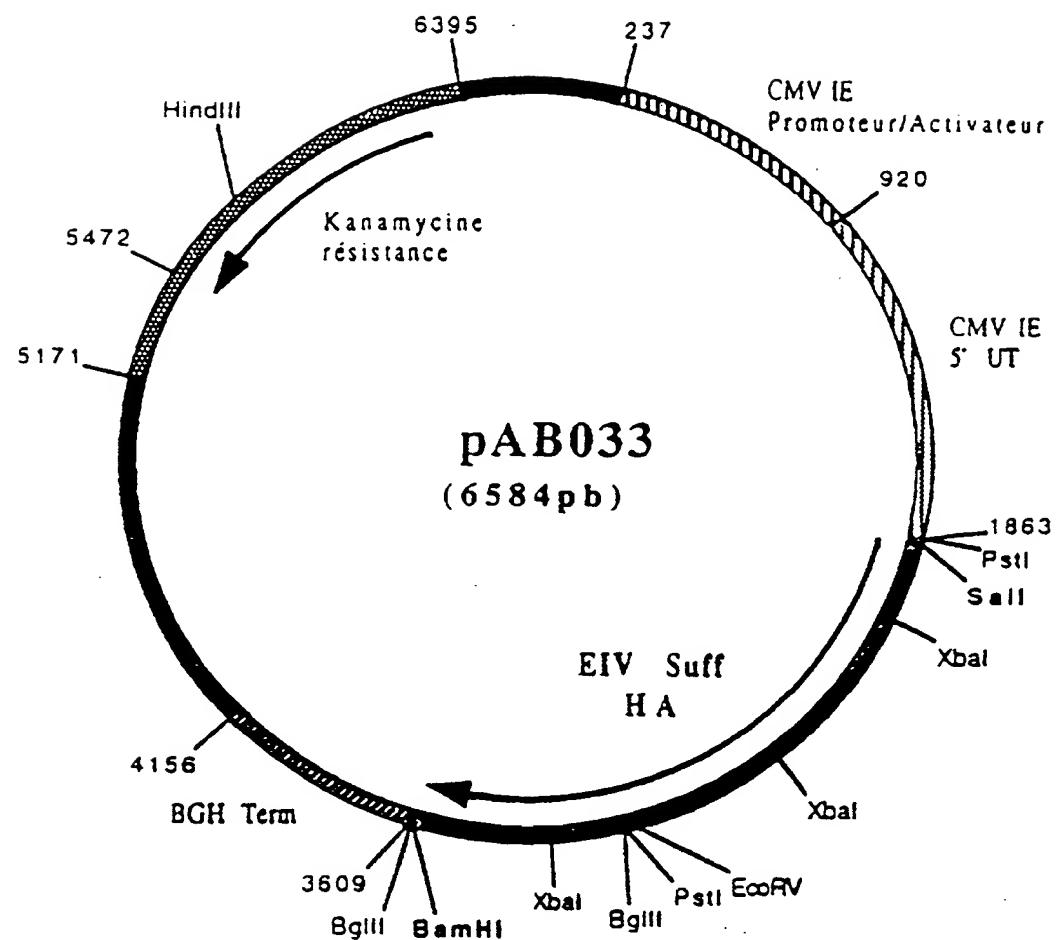


Figure N° 7

9 / 2 1

1198 ATTGAGAGGACCAATGAGAAATTCCATCAAATAGAGAAGGAATTCTCAGAAGTAGAAGGC  
 400 ▶ IleGluArgThrAsnGluLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerGluValGluGly  
 1261 ATCCAGGACTTGGAGAAGTATGAGAACACCAAAATAGACCTATGGTCCTACAATGCA  
 421 ▶ IleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAla  
 1324 TTACTGGTGGCTCTAGAAAATCAACATACGATTGACTTAACAGATGCAGAGATGAATAAA  
 442 ▶ LeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspAlaGluMetAsnLys  
 1387 TTCGAGAAGACTAGGCGCCAGTTAAGAGAAAACGCGGAAGACATGGGGGTGGATGTTTC  
 463 ▶ PheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyGlyCysPhe  
 1450 ATTTATCACAAATGTGATAATGCATGCATTGGATCAATAAGAAATGGGACATATGACCATT  
 484 ▶ IleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGlySerIleArgAsnGlyThrTyrAspHis  
 1513 ATATACAGAGATGAAGCATTAAACAAACCGATTTCAAATTAAAGGTGTTGAGTTGAAATCAC  
 505 ▶ IleTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSerC  
 1576 TACAAAGATTGGACTGTGGATTTCATTGCCATATCATGCTCTTAATTGCGTTGTT  
 526 ▶ TyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerPheAlaIleSerCysPheLeuIleCysValVal  
 1639 TTGGGTTTCATTATGTGGGCTTGCCAAAAAGGCAACATCAGATGCAACATTGCATTGA  
 547 ▶ LeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

Figure N° 8 (suite et fin)

11/21

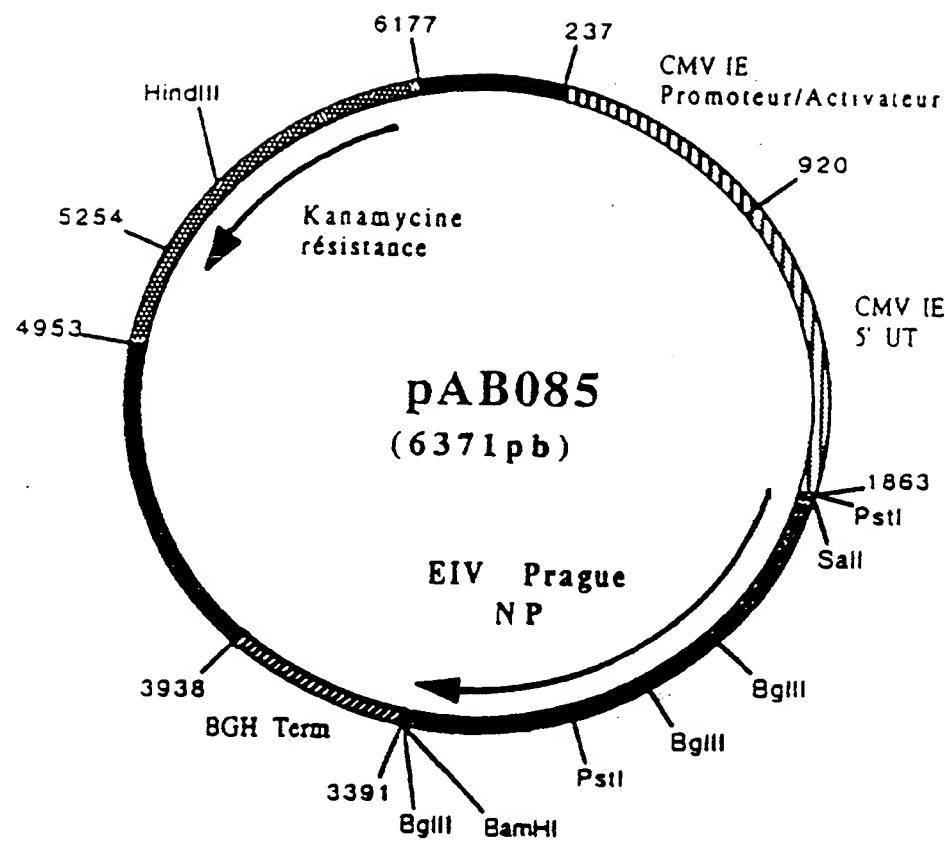


Figure N° 10

13/21

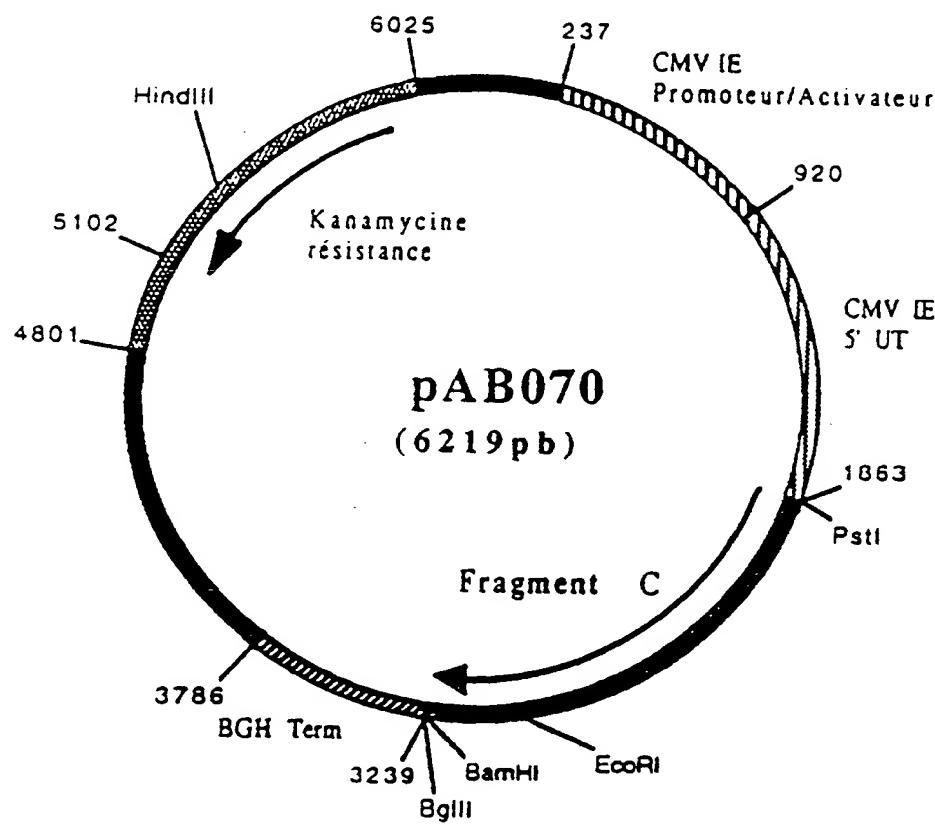


Figure N° 12

15/21

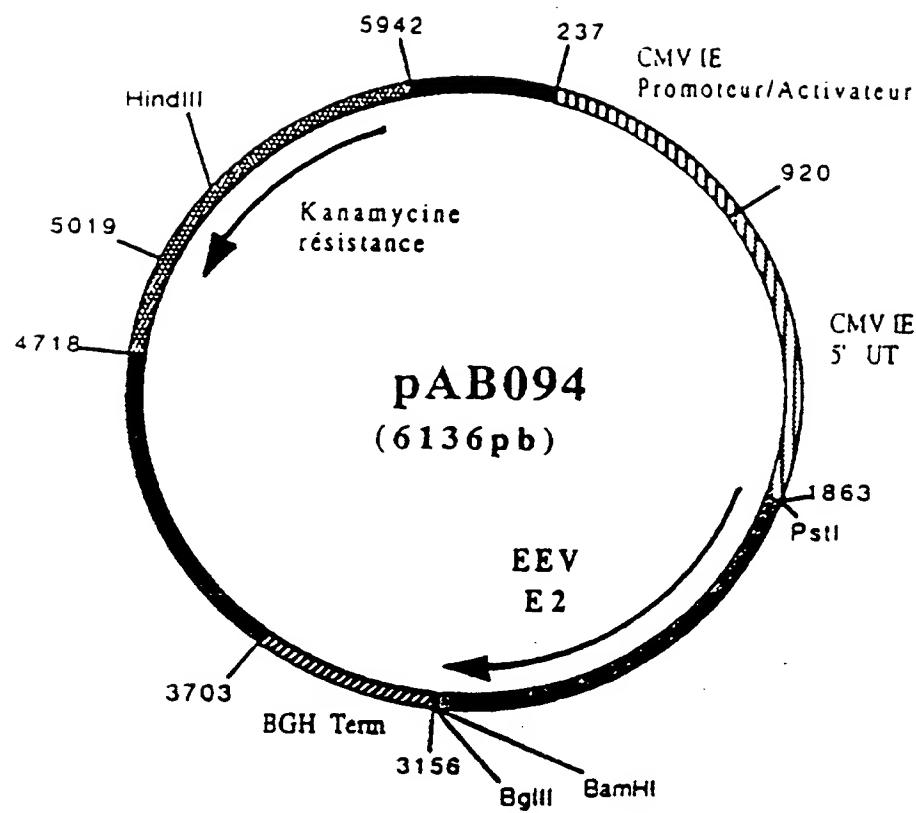


Figure N° 14

17/21

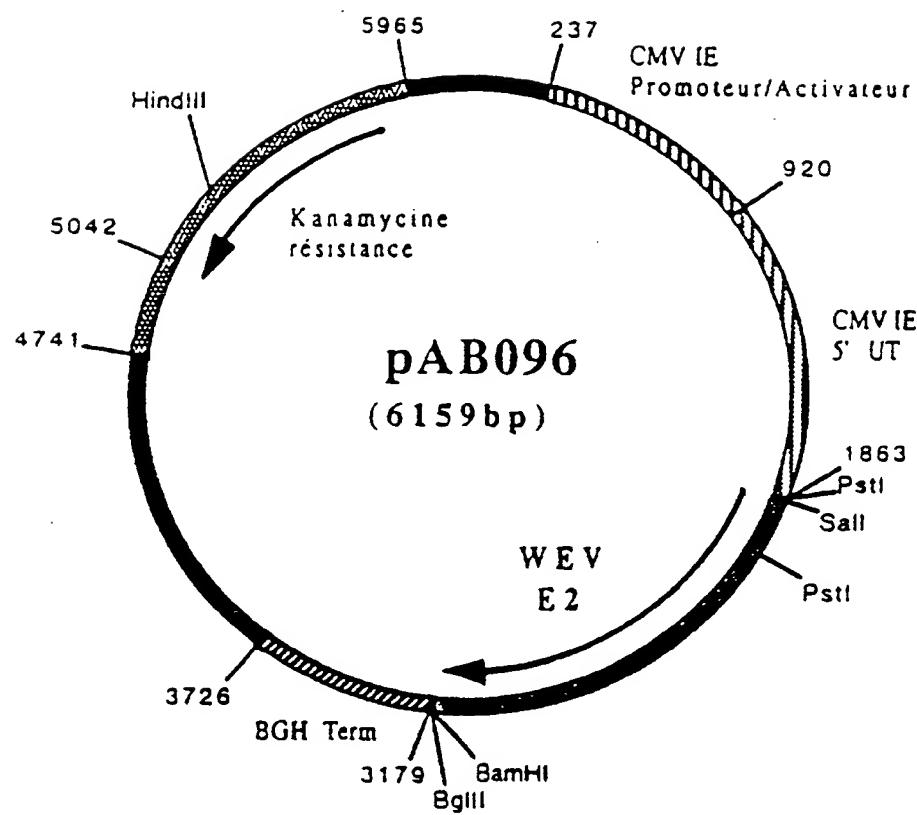


Figure N° 16

19 / 21

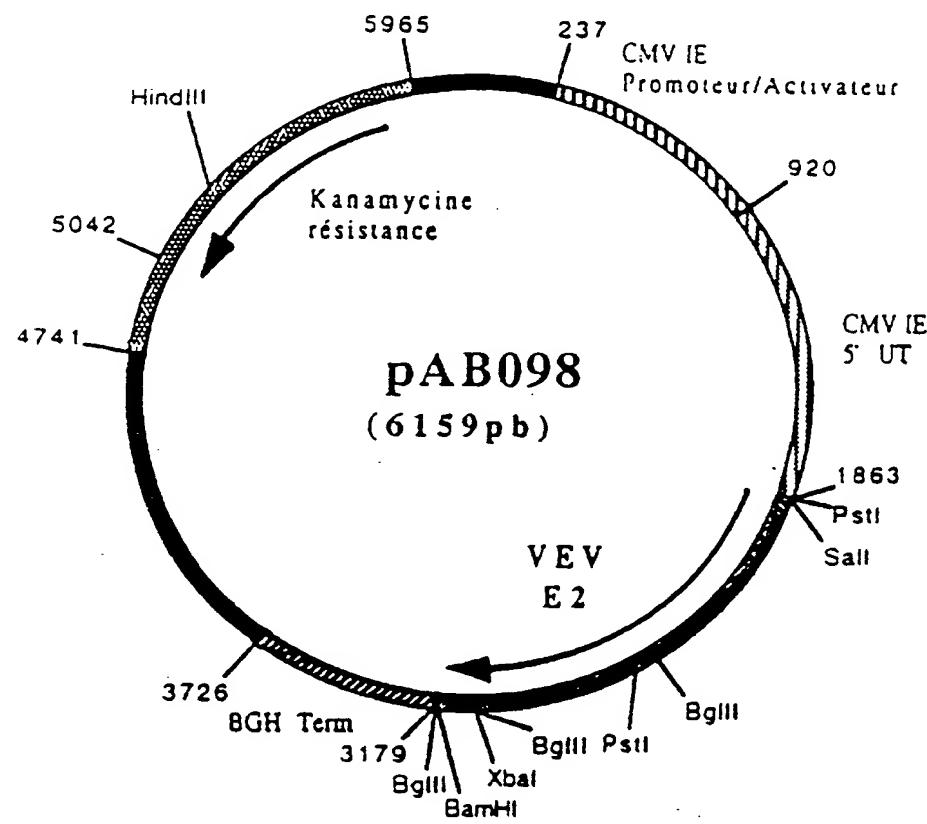


Figure N° 18

21/21

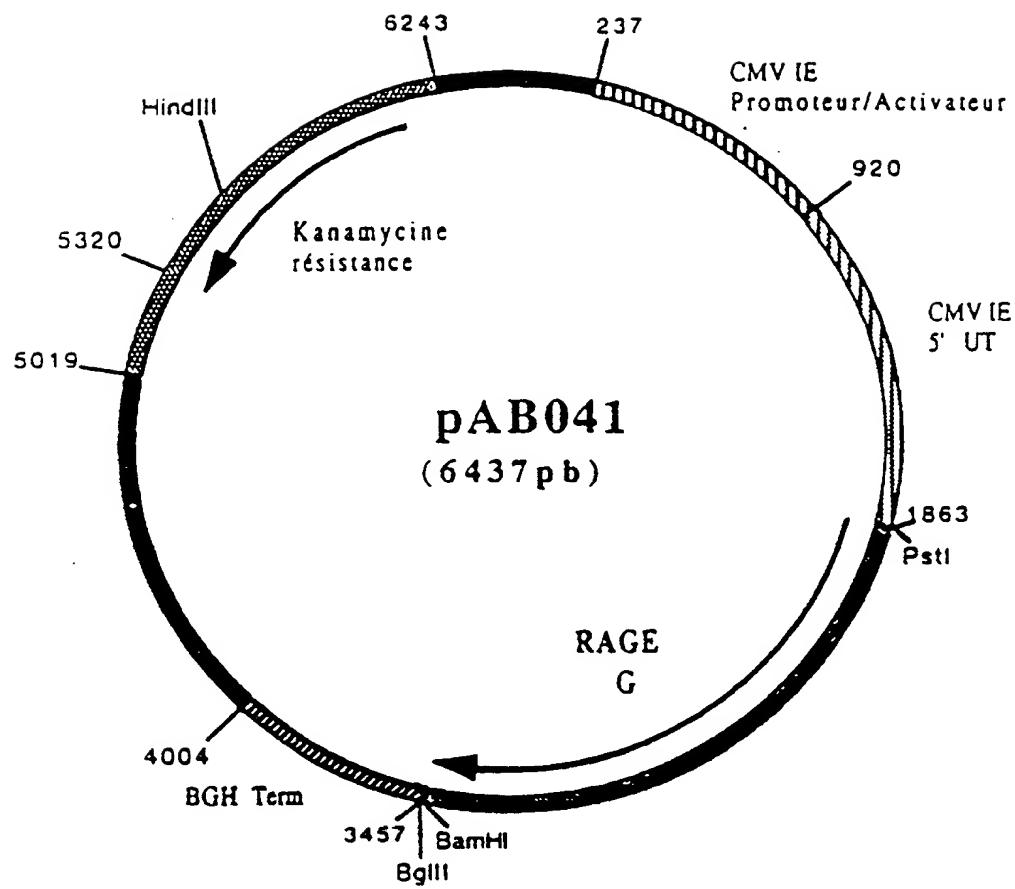


Figure N° 20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01314

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 447 303 A (RHONE MERIEUX) 18 September 1991 see the whole document ----	1-11
A	WO 93 19183 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 30 September 1993 see the whole document -----	1-10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No  
PCT/FR 97/01314

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K39/295 //C12N15/38, C12N15/44, C12N15/31

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-11
A	EP 0 304 786 A (MOBAY CORPORATION) 1 mars 1989 voir le document en entier ---	1-11
A	ULMER J B ET AL: "HETEROLOGOUS PROTECTION AGAINST INFLUENZA BY INJECTION OF DNA ENCODING A VIRAL PROTEIN" SCIENCE, vol. 259, 19 mars 1993, pages 1745-1749, XP002009751 ---	1-11

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### Catégories spéciales de documents cités.

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qui indique)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  21 novembre 1997	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  28/11/1997
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Moreau, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den Internationale No

PCT/FR 97/01314

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A US 5620896 A	03-08-95 06-11-96 15-04-97
EP 304786 A	01-03-89	US 4944942 A AU 615470 B AU 2152988 A CA 1337331 A JP 1071819 A	31-07-90 03-10-91 02-03-89 17-10-95 16-03-89
EP 447303 A	18-09-91	FR 2659349 A AT 142265 T AU 641493 B AU 7542091 A CA 2055489 A DE 69121746 D DE 69121746 T ES 2094207 T WO 9113995 A JP 5501206 T US 5266489 A	13-09-91 15-09-96 23-09-93 10-10-91 13-09-91 10-10-96 20-03-97 16-01-97 19-09-91 11-03-93 30-11-93
WO 9319183 A	30-09-93	US 5643578 A CA 2132836 A EP 0633937 A JP 7507203 T US 5620896 A	01-07-97 30-09-93 18-01-95 10-08-95 15-04-97